

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A) 昭62-294613

⑬ Int. Cl.⁴
A 61 K 31/41

識別記号
ADD
AAB
AAF
ABN
ACD

庁内整理番号
7330-4C

⑭ 公開 昭和62年(1987)12月22日

※審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑮ 発明の名称 酸化ストレスが原因の病気の治療のための薬剤

⑯ 特 願 昭62-120324

⑰ 出 願 昭62(1987)5月19日

優先権主張 ⑱ 1986年5月20日 ⑲ 西ドイツ (DE) ⑳ P3616923.4

㉑ 発 明 者 ミヒヤエル ヨーン ドイツ連邦共和国、デー-5020 プルハイム アウリケル
バルンハム ベーク 92

㉒ 出 願 人 アー. ナターマン ウ ドイツ連邦共和国、デー-5000 ケルン30, ナターマンア
ント コンパニー ゲ レー 1
ゼルシヤフト ミット
ベシユレンクテル
ハフツング

㉓ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外4名
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

酸化ストレスが原因の病気の治療のため
の薬剤

2. 特許請求の範囲

1. 活性物質として2-フェニル-1,2-ベンジソセレナゾール-3(2H)-オンを含んで
なる、酸化ストレスが原因の病気の治療のための
薬剤。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、2-フェニル-1,2-ベンジソセ
レナゾール-3(2H)-オン(略名:エプセレン
(Ebselen))の新規利用、すなわち酸化性ス
トレスが原因の病気の治療およびこの目的のため
の、この活性物質を含む薬剤に関する。

2-フェニル-1,2-ベンジソセレナゾール
-3(2H)-オンは、リウマチ病の治療に用い
られる周知の化合物であり(ドイツ特許第
3027073号、米国特許第4352799号)、
Bulletin de la Soc. Chim. de France

1976年(7/8),1124~1126頁のウェー
バー、レンソン(R.Weber, M.Renson)による、
2-メチルセレン-2-フェニル-ベンズアミド
と五塩化燐との反応およびその後の加水分解によ
る方法に従って製造される。

酸化ストレス

すべての好気性生体は、エネルギーを生み出す
ため酸素を用いる。しかし、酸素使用の利点は、
酸化プロセスが治療されなければならないような
障害の原因となりうる危険性とも関連しているとい
う多くの指摘がある。種々の活性酸素代謝産物
がそのような酸化プロセスに関係し、また同時に、
種々の生物学的物質を攻撃する。ほとんどすべての
種類の化合物が、そのような酸素化合物により酸化
損傷をうける。例えば、核酸、蛋白質並びに遊
離アミノ酸、脂質および炭化水素化合物は酸素毒
性により影響をうける。人間は、その酸化と抗酸
化プロセスの平衡を保つため、精製された広範囲
の、明らかにとても重要なシステムを有している
(シーズ(H.Sies)の酸化ストレス,2~4頁、

1985年参照)。

酸化プロセスへのこの平衡の移動は、2つの理由がある。

1. 活性酸素代謝産物の産出による抗酸化システムの過負担、および/または
2. 抗酸化システムの不全。

この結果は「酸化ストレス」という表現で要約された。今日そのような平衡の移動は多くの異なる病気、特に肝炎のような炎症性の病気、てんかんまたはパーキンソン病のようなCNS(中枢神経系)の病気、ぜん息のような肺組織の病気、痙攣、抗癌剤の副作用、パラクアットのような化学薬品、および照射の副作用並びに心筋梗塞のような冠状動脈循環の病気、が原因である。

2-フェニル-1,2-ベンゾセレナゾール-3(2H)-オンが、以下の試験管内試験によって示されるように、酸化ストレスが原因の病気の治療に有効な化合物であることは、驚くべき発見であった。

1. 化学ルミネセンス

に対する細胞または組織の反応であると考えてよい。エプセレンが刺激されたマウスのマクロファージより(以下の表1参照)または肝臓ミクロソームより発生した化学ルミネセンスを抑制することが示された。その結果、エプセレンは細胞または組織における酸化ストレスの生成物の抑制剤として考えられる。

表1 試験管内におけるチモサンにオプソニン
を作用させることにより、またはホル
ールミリスチン酸アセテート刺激マウス
腹膜マクロファージにより発生したCL
のエプセレンによる抑制

刺激物	細胞 ($1 \times 10^5 / \text{ml}$)	エプセレン濃度 ($\mu\text{mol} / \text{l}$)	抑制 比率
オプソニン化チモサン	内在マクロファージ	0.6	12
		1.8	40
		6.0	53
		18.3	97
ホルールミリスチン酸アセテート	ペルラム活性化マクロファージ	0.1	0
		1.0	17
		10.0	76

活性化細胞による、反応性酸素種の発生は、しばしば化学ルミネセンス(CL)の測定により決定される。形成したラジカル種は光子産出化学物質(ルミノール)と反応し、生じる光放出は光電池により測定される。化学ルミネセンスは白血球の刺激の結果として検出でき、その酸化細胞毒性活性の程度を示すものである(アラン(R.C. Allen)らのBiochem. Biophys. Res. Commun., 47巻、679頁、1972年参照)。それは刺激された人の血小板(バンダイク(K. van Dyke)らのMicrochem. J., 25巻、514頁、1980年参照)およびリンパ球(ヒュームス(D.A. Humes)らのBiochem. J., 198巻、661頁、1981年)により発生し、並びに肝臓、脳および肺組織により、酸化ストレスへと至る(カテナ(E. Cadenas)らの、Biochem. J., 192巻、303頁、1980年、ブバリス(A. Boveris)らのFed. Proc., 40巻、195頁、1981年参照)。

結果として、化学ルミネセンスは酸化ストレス

だから、エプセレンは、照射や化学毒性のような、酸化ストレスが過度に起こるような種々の状態の治療のための主成分を提供する。

2. ドキソルビシン誘発細胞毒性

多くの細胞毒性薬剤が癌の治療に用いられている(ヤング(R.C. Young)らのJ. Med., 305巻、139頁、1981年参照)。その細胞毒性のため、それらの化合物は多くの副作用を引き起す。その化合物の1種であるドキソルビシンは、反応性ラジカルの発生により副作用を引き起すと考えられている(トリトンおよびイー(T.R. Tritton and G. Yee)のScience, 217巻、248頁、1982年参照)。試験管内で、エプセレンが、ドキソルビシンによる細胞致死の抑制剤であることが示されている(表2参照)。H₂O₂掃去剤であるカタラーゼのような化合物もまた有効である。

以下余白

表2 MCF-7細胞におけるエプセレンによる
ドキソルビシンが原因の細胞死の抑制

化 合 物	対照(ドキソルビシンなし)に対する比率		
	ドキソルビシン 0.4 $\mu\text{mol/L}$	ドキソルビシン 0.5 $\mu\text{mol/L}$	ドキソルビシン 0.75 $\mu\text{mol/L}$
無	60	49	42
エプセレン (5 $\mu\text{mol/L}$)	—	74	—
カタラーゼ (3000U/mL)	91	87	69

これらのデータは、エプセレンがラジカル誘発化学物質の損傷作用から細胞をまもることができることを示している。環境毒性を引起す種々の化学物質は酸化ラジカルストレスを引起すことが知られているので、上記の試験は、エプセレンが通常そのような酸化ストレス反応の治療に有効であることを示している。

3. ジクワット(diquat)誘発細胞毒性

酸化還元循環をうけると知られているビビリジ

グルタチオンペルオキシダーゼ活性を有するエプセレンも細胞毒性に対し防護しないが、ジクワットが関係した脂質過酸化を抑制する。しかし、エプセレンがGSHまたはN-アセチルシステインのどちらかと組み合わせて加えられた場合、細胞内GSHレベルのジクワットが関係した消失が明らかに遅れ、細胞死はインキュベーションの少なくとも最後の3時間までみられなかった。これらの結果は、エプセレンがジクワットおよび酸素ラジカルおよびヒドロペルオキシドが基礎となるプロセスによって誘発される酸化ストレスのもとでの他の病的状態を防ぐに有効であることを示している。

4. 試験管内での脂質過酸化

体重約200gの雄成体のウィスター系ラットを実験に用いた。この実験動物を標準条件、すなわち、アルトロミン(Altromin)飼料、通常の飲料水、マクロロン(Makrolon)ケージ、12時間のリズムでのネオン照明、22℃、および湿度30%で飼育した。

ウレタン麻酔(体重あたり25%水溶液を5

リウム化合物であるジクワットの細胞毒性のメカニズムを調べるため、折衷単離肝細胞システムを用いる。スーパーオキシド陰イオン O_2^- および H_2O_2 は、この肝細胞モデルにおいて、ジクワットの循環還元および酸化の結果として生ずる。折衷肝細胞はグルタチオン還元酵素活性を抑制するため、1,3-ビス-(2-クロロエチル)-1-ニトロソウレアによる前処理により調製される。この折衷肝細胞へのジクワットの添加は、細胞内グルタチオンレベル(GSH)をすばやく消失させ、GSSG形成を増やし、1時間以内に明らかな細胞死を引起す。1,3-ビス-(2-クロロエチル)-1-ニトロソウレアで前処理しないで肝細胞に加えた場合、ジクワットはGSH/GSSGレベルを変えず、細胞死にもならず、ジクワット発生 H_2O_2 に対する防護におけるグルタチオン還元酵素/ペルオキシダーゼ酵素システムの重要性を示している。インキュベーションへのグルタチオン(GSH)またはN-アセチルシステインの添加は、ジクワット細胞毒性に対して折衷肝細胞を防護しない。

腹腔内)下、門脈を通して生理的NaCl溶液で洗った後、肝臓をとりだす。肝臓ミクロソームを超速心により、通常の方法で調製した。新鮮に調製したミクロソーム懸濁液を、すべてのテストに用いた。ミクロソーム成分をpH7.4の磷酸バッファー溶液に懸濁した。肝臓ミクロソームでのアスコルビン酸により1時間以内に刺激された脂質過酸化のテストは、標準方法で行なわれた。1時間後に脂質過酸化の間に生じたマロンジアルデヒドを分光測定で定量した。その濃度は脂質過酸化の間接的分量として用いる。このテスト生成物を、テストサンプルに10 μl のエタノール溶液となるよう加える(5 ml 中5 μg のミクロソーム蛋白)。この少量のエタノール濃度は脂質過酸化に何の影響もない。

対照として、アスコルビン酸刺激より生ずるマロンジアルデヒド濃度を100%与える。テストする化合物を含む各サンプルを、この対照に關して与える。得られたデータより平均値 \pm SEMを計算する。有意差を学生t-テスト分布の検定に

より計算する。 $p < 0.05$ の差を有意であると考ええる。1時間後のアスコルビン酸により刺激されたマロンジアルデヒドの形成(対照)は $84.6 \pm 14.7 \text{ nM/ml}$ (平均 \pm SEM; n :すべての対照、正常値、100%値)であった。マロンジアルデヒドの形成開始後に各テストサンプルにエブセレンを、テストサンプル ml あたり $36 \sim 360 \text{ nM}$ の濃度で加えると、テスト化合物のすべての濃度で、マロンジアルデヒド形成を減らした($76 \sim 90\%$; 各ケースとも $p < 0.001$)。

アスコルビン酸との反応開始前3.0分に、テストサンプル ml あたりエブセレンを $36 \sim 360 \text{ nM}$ の濃度で加えた場合、 36 nM/ml テスト体積の濃度ではマロンジアルデヒド形成は生じず、一方テスト体積 ml あたり $72 \sim 360 \text{ nM}$ を加えると、完全なマロンジアルデヒド形成の開始となった($p < 0.001$)。

このように、エブセレンは低濃度では脂質過酸化を抑制し、ラジカル掃去剤として連鎖反応の初期の段階で働く。だから、エブセレンは、過剰な

表した;

$$\text{H}_2\text{O}_2, 1.1 \times 10^6$$

$$t\text{-ブチルヒドロペルオキシド}(t\text{-BuOOH}), 1.17 \times 10^6$$

$$\text{クモルヒドロペルオキシド}(CuOOH), 1.7 \times 10^6$$

これらの条件下で、牛血球からの精製GSH- P_x は、酵素結合セレンウムのモルあたり 10^{10} U の活性を示した。

エブセレンおよび哺乳類のセレン-酵素GSH- P_x は、無機並びに種々の有機ヒドロペルオキシドの両方の反応を触媒する。しかしエブセレンは天然の酵素とは異なり、天然の酵素は基質としてのGSHに高い特異性があるが、一方エブセレンは多くのその他のチオールとの反応を触媒する。

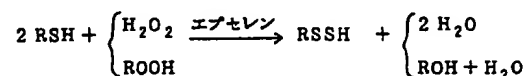
種々のチオールに対する偽酵素の活性
($t\text{-BuOOH}$, $\Delta \log \text{GSH}$ の代わりにエブセレン $\Delta \log \text{RSH}$)

グルタチオン	117×10^6
システイン	2.5×10^6
N-アセチル-システイン	0.47×10^6
3-メルカプトプロピオン酸	1.05×10^6
2-メルカプト酢酸エチルエステル	3.8×10^6
エリスロ-1,4-ジメルカプト-2,3-ブタンジオール	4.6×10^6

脂質過酸化を形成する酸化ストレスが原因の病的状態の抑制および治療に相当であると考えられる。

5. グルタチオンペルオキシダーゼの性質

試験管内テストにおいて、チオール存在下で用いられた際のペルオキシドの分解を触媒する2-フェニル-1,2-ベンジソセレンゾール-3(2H)-オン(エブセレン)の可能性を示した。



このエブセレンの性質は哺乳類の酵素、グルタチオンペルオキシダーゼ(GSH- P_x)の性質と同じである。だから、エブセレンは偽酵素として働く。

チオールの反応性はウェンデルの方法(A. Wendel, Methods in Enzymology, 77巻, 325~333頁(1981年))によって測定する。以下の偽酵素活性値を、基質として(1 mmol/l)グルタチオン(GSH)を用いて測定し、エブセレン中セレンウムの mol/l あたり $\Delta \log \text{GSH/min}$ のグルタチオンペルオキシダーゼユニット(U)で

このテストに従い、成人呼吸困難症(ARDS)を含む気管支系の病気または抗癌剤の副作用のような酸化ストレスによる病気、てんかんまたはパーキンソン病のようなCNS病、照射障害またはパラコートのような化学物質の毒性作用、肝臓疾患、心筋梗塞のような心臓循環病、または乾癬に対する、貴重な予防薬および/または治療薬として、エブセレンを用いてもよい。

さらに本発明は、活性物質としてエブセレンを含む薬剤に関する。本発明に係る薬剤は腸内並びに口または直腸並びに非経口で投与される。それらは、薬剤活性物質として、エブセレンのみまたは通常薬剤的に適当な担体物質を共に含む。錠剤、糖衣錠、カプセル、座薬、顆粒、溶液、乳剤または懸濁液のような望ましい治療法に従って一回の投与形として活性剤を含む薬剤が好ましい。通常のエブセレンの投与量は1日あたり10~2000mgの間であり、好ましくは30~300mgの間であり、1回でまたは数回にわけて投与してもよく、好ましくは1日2~3回にわけて投与

してもよい。

本発明に係る薬剤の製造を以下の例によって説明する。

例 1

錠剤

2-フェニル-1,2-ベンジソセナゾール
-3(2H)-オン 30mg

ラクトース 150mg

結晶セルロース 50mg

カルシウムカルボキシメチルセルロース 7mg

ステアリン酸マグネシウム 3mg

上記の成分を混合し、通常の方法で錠剤に圧縮する。望むなら、この圧縮した粗製錠剤を通常の方法で包む。

例 2

錠剤

2-フェニル-1,2-ベンジソセナゾール
-3(2H)-オン 50mg

微結晶セルロース 150mg

キャテナ^(B)(Cutina^(B))HR 15mg

ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート 20mg

例 3

カプセル

2-フェニル-1,2-ベンジソセナゾール
-3(2H)-オン 30mg

ラクトース 102mg

結晶セルロース 56mg

コロイドシリシウムジオキシド 2mg

上記成分を通常の方法で混合し、粗砕し、ハー
ドセラチンのカプセルにつめる。

例 4

カプセル

2-フェニル-1,2-ベンジソセナゾール
-3(2H)-オン 50mg

タルク 5mg

エアロゾル 200 10mg

以下余白

第1頁の続き

⑤Int.Cl.⁴

A 61 K 31/41

// C 07 D 293/06

識別記号

ADA
ADQ

庁内整理番号

7330-4C